



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALIA

Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Website: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 13/10/2020

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

« MRSA/SA ELITe MGB Kit » Ref. M800351

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following changes:

- *Introduction of the new product reference "ELITe InGenius Sonication tubes" (ref. INT032SON) to be used in combination with the product for sample sonication.*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



MRSA/SA ELITe MGB® Kit

Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
EXPLICAÇÃO DO ENSAIO	página 2
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 4
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 4
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 4
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 5
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 6
ELITE INGENIUS®	página 7
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 7
PROCEDIMENTO	página 8
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 15
OUTROS SISTEMAS	página 18
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 18
PROCEDIMENTO	página 20
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 24
REFERÊNCIAS	página 29
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 29
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 30
SÍMBOLOS	página 32
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 33

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «MRSA/SA ELITe MGB® Kit» faz parte de um ensaio de amplificação de ácidos nucleicos qualitativo para a **deteção de *Staphylococcus aureus* (SA)** e de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA, incluindo a recentemente identificada estirpe mecC) em amostras de ADN extraídas de zaragatoas nasais e hemocultura.

O produto destina-se a auxiliar na prevenção e controlo de infeções por MRSA nos contextos de saúde e a auxiliar no diagnóstico de infeções por MRSA, e não a orientar ou a monitorizar o tratamento de infeções por MRSA. Um resultado negativo não exclui colonização nasal de MRSA/SA. São necessárias culturas simultâneas para recuperar organismos para tipificação epidemiológica ou para testes de suscetibilidade adicionais.

MRSA / SA ELITe MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

EXPLICAÇÃO DO ENSAIO

Staphylococcus aureus é um agente patogénico oportunista transportado como um organismo comensal na pele e nas narinas de cerca de 30% da população normal, causando potencialmente um leque alargado de doenças. O SA e em especial o MRSA são consistentemente a causa líder de infeções nosocomiais e estão associados a uma morbilidade, mortalidade e custos substanciais. A emergência de infeções de MRSA associadas à comunicada requer a vigilância ativa de SA e MRSA dos pacientes internados nos hospitais ou noutras instituições de saúde, para identificar pacientes que possam servir como transmissores de infeções a outros pacientes.

O «MRSA / SA ELITe MGB® Kit» consiste num ensaio baseado em amplificação em tempo real triplex que visa as regiões conservadoras num **gene específico do *Staphylococcus aureus***, responsável pela identificação de SA coagulase positivo. O ensaio visa também o **gene *mecA***, incluindo a variante ***mecC***, que foi recentemente designado de **gene *mecC*** (Ito T. et al.), responsável pela resistência à metilicina e outros antibióticos beta-lactâmicos e um controlo interno exógeno, para controlar a inibição da reação e a integridade do reagente.

O gene específico de *Staphylococcus aureus* irá identificar de forma unívoca o SA coagulase positivo e os genes *mecA* irão identificar de forma unívoca a resistência à metilicina. A presença de ambos os marcadores na mesma quantidade relativa medida por uma diferença no valor do limiar do ciclo é indicativo de MRSA; diferentes quantidades relativas ou a presença apenas do marcador do gene específico de *Staphylococcus aureus* é indicativo de SA.

Os ensaios baseados em amplificação em tempo real de MRSA/SA diminuem significativamente o tempo de laboratório em comparação com os testes de cultura padrão, aumentando a eficácia do procedimento. Os testes de deteção de MRSA por PCR em tempo real atuais visam o local de inserção do SCCmec (*elemento genético móvel transportador de mecA* designado de cassete cromossómico estafilocócico), e/ou o gene *mecA* e/ou o gene *spa*. O «MRSA / SA ELITe MGB® Kit» visa as regiões conservadoras nos marcadores genéticos de MRSA e SA, minimizando desta forma os resultados falsos negativos devido à variabilidade num local de inserção de SCCmec natural e minimizando os resultados falsos positivos devido a um problema de “cassete vazio”.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste numa reação de amplificação em tempo real com um termóstato programável fornecido com um sistema ótico de deteção de fluorescência.

A sonda específica do gene específico de SA baseia-se na tecnologia ELITe MGB®, etiquetada com fluoróforo AP554 (semelhante a TAMRA) e é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do *Staphylococcus aureus*.

As sondas específicas dos genes *mecA* e *mecC* baseiam-se na tecnologia ELITe MGB®, etiquetada com fluoróforo FAM e são ativadas quando hibridizadas com o produto específico das reações de amplificação do gene de resistência a antibióticos.

A sonda específica do controlo interno baseia-se na tecnologia ELITe MGB®, etiquetada com fluoróforo AP642 (semelhante a Cy5) e é ativada quando hibridizada com o produto específico da amplificação do controlo interno.

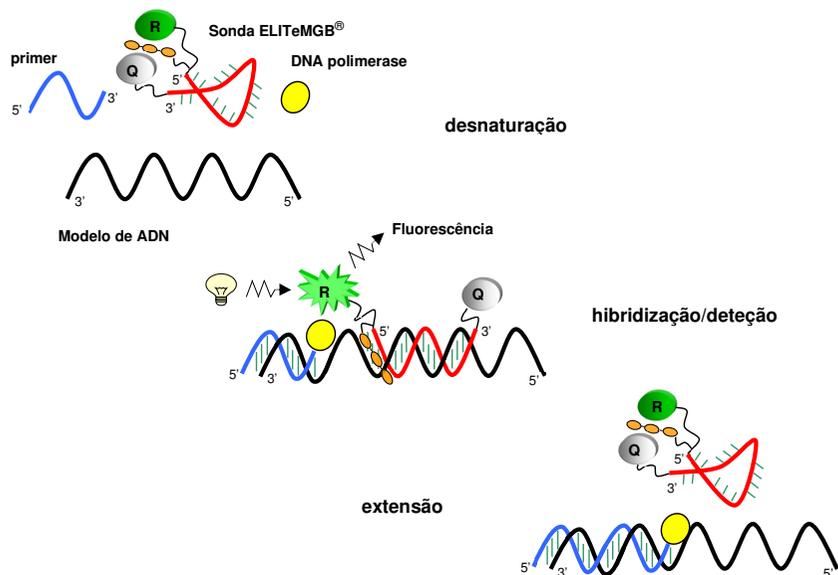
À medida que a quantidade de produto específico da amplificação aumenta, a emissão de fluorescência aumenta e é medida e registada pelo instrumento. O processamento dos dados permite detetar a presença de ADN de MRSA ou SA na amostra inicial.

O ensaio é validado com os sistemas descritos nestas instruções de utilização.

MRSA / SA ELITe MGB® Kit
 Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Na imagem seguinte é mostrado o mecanismo de ativação e a emissão de fluorescência da sonda da tecnologia ELITe MGB®. Tenha em atenção que a sonda não é hidrolisada durante o ciclo de amplificação.



MRSA / SA ELITe MGB® Kit
 Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «MRSA/SA ELITe MGB® Kit» fornece uma mistura completa **pronta a utilizar** para a amplificação em tempo real numa solução de estabilização. A mistura é alíquotada em **quatro tubos de teste prontos a usar**. Cada tubo contém **540 µL** de solução, suficiente para **24 testes** em associação com o «**ELITe InGenius®**» e **25 testes** em associação com outros sistemas.

Os primers e sonda específicos do gene do *Staphylococcus aureus* (estabilizados pelo grupo MGB®, identificados com o fluoróforo AP554 (AquaPhluor® 554), semelhante ao TAMRA, e extintos por uma molécula não fluorescente) são específicos de uma região conservadora no *Staphylococcus aureus* coagulase positivo.

Os primers e sondas específicos do gene *mecA* e *mecC* (estabilizados pelo grupo MGB®, etiquetado com fluoróforo FAM e inativado por uma molécula não fluorescente) são específicos de regiões conservadoras nos genes *mecA* e *mecC* que são responsáveis pela resistência à meticilina e a outros antibióticos beta-lactâmicos.

Os primários e a sonda para o Controlo Interno (estabilizado com o grupo MGB®, etiquetado por fluoróforo AP642, semelhante ao Cy5, e inativado por uma molécula não fluorescente) são específicos de um ADN de plasmídeo não infeccioso contendo sequências artificiais de **controlo interno**.

A mistura de reação fornece também tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos nucleótidos, fluoróforo AP593 (semelhante ao ROX) usado como referência passiva para normalizar a fluorescência, a enzima Uracil-N-glicosidase (UNG) para inativar a contaminação por um produto de amplificação e a enzima DNA polimerase de "arranque a quente".

O produto é suficiente para **96 testes em associação com o ELITe InGenius**, incluindo controlos.

O produto é suficiente para **100 testes em associação com outros sistemas**, incluindo controlos.

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação de perigo
MRSA/SA PCR Mix	Mistura de reação completa	4 x 540 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas sem pó descartáveis em nitrilo ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrifugadora de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas de barreira contra aerossóis estéreis ou pontas de deslocação positiva estéreis (2 - 20 µL, 5 - 50 µL, 50 - 200 µL, 200 - 1000 µL).
- Água de grau de biologia molecular.
- Caldo de soja Trypticase.
- Ciclador térmico programável com sistema ótico de deteção de fluorescência 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems®) ou 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) calibrado de acordo com as instruções do fabricante.

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para a colheita da amostra e extração do ADN das amostras, o controlo interno, o positive control da amplificação e os consumíveis **não estão** incluídos neste produto.

É recomendável utilizar o produto genérico «**eSwab Collection Kit**» (Copan, ref. 480CE) para colheita de amostras dos pacientes quando o ensaio for usado em combinação com o «**ELITE InGenius**»

É recomendável utilizar o produto genérico, «**eNAT™ kit**» (Copan, ref. 608CS01R), para colheita de amostras dos pacientes quando o ensaio for usado em combinação com o «**ELITE InGenius**».

É recomendável utilizar o produto genérico, «**BBL CultureSwab Plus Amies Gel without Charcoal swabs**» (Becton-Dickinson, ref. 220116), para colheita de amostras do paciente quando o ensaio for usado em combinação com a extração EasyMag e o ciclador térmico 7500 Fast Dx Real-Time PCR.

Para a extração de ADN automática, amplificação em tempo real e interpretação dos resultados das amostras a serem analisadas, é necessário o instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) e os seguintes protocolos de Ensaio específicos:

parâmetros para o positive control da amplificação «**MRSA-SA ELITE_PC**» (ELITechGroup S.p.A.),

parâmetros para o negative control da amplificação «**MRSA-SA ELITE_NC**» (ELITechGroup S.p.A.),

- parâmetros para amostras a serem analisadas «**MRSA-SA ELITE_NS_200_50**» e «**MRSA-SA ELITE_BC_200_100**» (ELITechGroup S.p.A.).

Para análise de amostras automática com o instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) são necessários os seguintes produtos genéricos:

- cartuchos de extração «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),

- consumíveis para extração e amplificação «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS),

- consumíveis para sonicação «**ELITE InGenius® Sonication tubes**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032SON),

- cartuchos de amplificação «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR),

- pontas «**300 µL Universal Filter Tips**» (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),

- caixas «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000).

Para a extração automática de ADN das amostras a serem analisadas, também foram validados os seguintes produtos genéricos «**NucliSENS® easyMAG® Strip for Premix**» (bioMérieux SA, ref. 278303), «**bioHit Electronic Multichannel Pipettor**» (bioMérieux SA, ref. 280141), «**Filter tips for bioHit**» (bioMérieux SA, ref. 280146) e «**NucliSENS® easyMAG® Reagents**» (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) para utilização com o instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, ref. 200111).

Como modelo do controlo interno da extração e inibição, é necessário o produto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTCPE). Esta é uma solução estabilizada contendo dois ADNs plasmídeos e ARN genómico do fago MS2.

Quando for usado o 7500 Fast Dx Real-Time PCR System para amplificação de ADN, é necessário usar o produto genérico «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC02), microplacas com poços de 0,1 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

Quando for usado o Sistema de PCR em tempo real 7500 para amplificação de ADN, é necessário usar o produto genérico «**Microplacas Q - PCR**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC01), microplacas com furos de 0,2 mL e folhas vedantes adesivas para amplificação em tempo real.

É necessário usar o produto principal, o positive control da amplificação de ADN do plasmídeo «**MRSA/SA - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. M800356), como positive control da amplificação.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido exclusivamente para utilização *in vitro*.

Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Os materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com 3% de hipoclorito de sódio ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.

Leia atentamente todas as instruções fornecidas no produto antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas no produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos no produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos, requerem colaboradores qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou à contaminação da amostra por produtos de amplificação.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca introduza um produto de amplificação na área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

Quando a sessão de amplificação for configurada manualmente, é necessário ter disponíveis batas, luvas e ferramentas de laboratório que sejam exclusivamente usadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação. Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada de amplificação/deteção de produtos de amplificação para a área designada de extração/preparação de reações de amplificação.

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os produtos de amplificação devem ser manuseados de modo a reduzir, tanto quanto possível, a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação. As pipetas usadas no manuseamento de produtos de amplificação devem ser usadas exclusivamente para este fim.

MRSA / SA ELITE MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Avisos e precauções específicos para os componentes

A **MRSA/SA PCR Mix** deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

A **MRSA/SA PCR Mix** pode ser congelada e descongelada num máximo de **cinco sessões**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

ELITE InGenius®

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com o ADN extraído das seguintes amostras clínicas:

Zaragatoa nasal

As amostras de zaragatoas nasais, destinadas à extração de ADN, devem ser colhidas com os seguintes sistemas de colheita e transporte:

«**eNAT™ kit**» (COPAN Italia S.p.A., ref. 608CS01R) para a extração de ADN, identificado de acordo com as diretrizes laboratoriais. A zaragatoa nasal deve ser transportada e armazenada a +2 / +8 °C durante até quatro semanas; caso contrário, tem de ser congelada e armazenada a -20 °C durante um período máximo de seis meses. Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra em meio eNAT™ para o tubo de sonicação fornecido com «**ELITE InGenius Sonication tubes**».

«**eSwab Collection Kit**» (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE) para extração do ADN, identificado de acordo com as diretrizes laboratoriais, e transportado preferivelmente dentro de 2 horas após a colheita. Caso a entrega ou o processamento imediatos estejam atrasados, as amostras devem ser transportadas e armazenadas a +2 / +8 °C durante até 48 horas; caso contrário, têm de ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de seis meses. Antes da análise com este produto, devem ser transferidos 0,2 mL da amostra em meio eSwab para o tubo de sonicação fornecido com «**ELITE InGenius Sonication tubes**».

Nota: Quando a extração de ADN de zaragatoas nasais **for realizada** com o **ELITE InGenius** e o **ELITE InGenius Software®** versão **1.2** (ou versões equivalentes mais recentes), use o protocolo de extração **MRSA-SA ELITE_NS_200_50**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE Internal Control** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 50 µL.

Hemocultura

As amostras de hemocultura para extração de ácido nucleico devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais. As amostras têm de ser transportadas e armazenadas à temperatura ambiente durante um máximo de 24 horas.

Antes da análise com este produto, dilua a amostra numa relação de 1:1000 em água ultrapurificada (pelo menos 10 µL de amostras em 10 mL de água ultrapurificada), misture por meio de vórtice e transfira 0,2 mL de amostras diluídas para um tubo de sonicação fornecido com «**ELITE InGenius Sonication tubes**».

Recomenda-se a separação das amostras a serem congeladas em alíquotas para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

NOTA: quando a extração de ácidos nucleicos da hemocultura for realizada com o **ELITE InGenius** e o **Software ELITE InGenius** versão 1.2 (ou versões equivalentes posteriores), utilize o protocolo de extração **MRSA-SA ELITE_BC_200_100**. Este protocolo processa 200 µL de amostra, adiciona o **CPE** a 10 µL/extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Substâncias interferentes

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

MRSA / SA ELITE MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Controlos de amplificação

Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar os controlos de amplificação para cada lote do reagente de amplificação:

- como positive control da amplificação, use o **MRSA/SA - ELITE Positive Control** em associação com o protocolo «**MRSA-SA ELITE_PC**»,
- como negative control da amplificação, use água de qualidade molecular (não fornecida com este kit) em associação com o protocolo «**MRSA-SA ELITE_NC**».

Nota: O sistema **ELITE InGenius** requer resultados aprovados e válidos dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados.

Os resultados do controlo da amplificação, aprovados e guardados na base de dados, irão expirar após **15 dias**. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Positive e Negative Controls em associação com o lote do reagente de amplificação.

Para além disso, os controlos da amplificação devem ser novamente executados quando:

- for iniciado um novo lote de reagentes de amplificação,
- os resultados da análise de controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizado qualquer serviço de manutenção significativo no instrumento **ELITE InGenius**.

Controlos da qualidade

Recomenda-se a validação de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, testando os Controlos do processo, ou seja, uma amostra que testou negativo e uma amostra que testou positivo ou um material de referência calibrado.

Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável.

PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do «**MRSA/SA ELITE MGB® Kit**» com o sistema **ELITE InGenius** consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema
- preparação da sessão
- revisão e aprovação de resultados

Verificação da prontidão do sistema

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o **ELITE InGenius** e selecionar o modo «**CLOSED**» (Fechado);
- certificar-se de que os controlos da amplificação (**MRSA/SA - Positive Control**, **MRSA/SA Negative Control**) foram executados, aprovados e não estão expirados (Estado) em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado. Se não existirem controlos da amplificação aprovados ou válidos, execute-os como descrito nos parágrafos seguintes.
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela ELITechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits **ELITE MGB**, matrizes e o instrumento **ELITE InGenius** e a matriz citada.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para o «MRSA/SA ELITe MGB® Kit» estão descritos na tabela seguinte.

Protocolo de ensaio para o MRSA/SA ELITe MGB Kit			
Nome	Matriz	Unidade do relatório	Características
MRSA-SA ELITe_NS_200_50	Zaragatoa nasal	Positivo/Negativo	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 50 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: 1 ciclo, 5 seg. ligado Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL
MRSA-SA ELITe_BC_200_100	Hemocultura	Positivo/Negativo	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL

Se o protocolo do ensaio que precisa não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup da sua localidade.

Preparação da sessão

O produto **MRSA/SA ELITe MGB® Kit** pode ser usado com o sistema **ELITe InGenius** para realizar:

- Execução integrada (Extract + PCR) (Extração + PCR),
- Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução do positive control e negative control da amplificação (apenas PCR),

Todos os parâmetros necessários para a sessão estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente recuperados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: o sistema **ELITe InGenius** pode ser ligado ao "Location Information Server" (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível enviar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Estão descritos a seguir os passos principais para a preparação dos quatro tipos de execução.

A. Execução integrada

Para preparar a execução integrada efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

- Descongele os tubos da MRSA/SA PCR Mix em número suficiente para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Descongele os tubos CPE para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
- Se forem processadas amostras de zaragatoas nasais, certifique-se de que o Volume de entrada de extração é de 200 µL e que o Volume de eluição extraído é de 50 µL.
- Se forem processadas amostras de hemocultura, certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é de 200 µL e que o "Volume de eluição extraído" é de 100 µL.
- Para cada Rastreio de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o protocolo do ensaio a ser usado na coluna "Ensaio" (ou seja, MRSA SA ELITe_NS_200_50).
- Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR".
- Selecione a posição de carregamento da amostra na coluna "Posição da amostra" e selecione "Tubo de sonicação". Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Carregue a CPE e a MRSA/SA PCR Mix no Inventory Block selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue as "PCR Cassettes", os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP 200", todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas nas posições especificadas no passo 8, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
- Feche a porta do instrumento.
- Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída pode ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem produzir contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **15 horas** (5 sessões de trabalho de 3 horas cada).

B. Execução da amplificação

Para configurar uma execução de amplificação, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Descongele um número suficiente de tubos de mistura de PCR de MRSA/SA para a sessão. Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
3. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração e se forem processadas amostras de zangaratoas nasais, certifique-se de que o volume de entrada da extração é de 200 µL e que o volume de eluição extraído é de 50 µL.
4. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração e se forem processadas amostras de zangaratoas nasais, certifique-se de que o volume de entrada da extração é de 200 µL e que o volume de eluição extraído é de 100 µL.
5. Para cada Rastreo de interesse introduza a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
6. Selecione o protocolo do ensaio a ser usado na coluna "Ensaio" (ou seja, MRSA SA ELITE_NS_200_50).
7. Selecione "PCR Only" (apenas PCR) na coluna "Protocol".
8. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra eluída na coluna "Sample Position" é "ExtraTube (fila inferior)". Clique em "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue a MRSA/SA PCR Mix no Inventory Block selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue as "PCR Cassettes" e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o **ELITE InGenius** permite ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída pode ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as PCR Cassettes com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidos do instrumento e eliminados sem produzir contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **15 horas** (5 sessões de trabalho de 3 horas cada).

C. Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo

Para preparar a execução do positive control e do negative control da amplificação, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele um número suficiente de tubos de mistura de PCR de MRSA/SA para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 24 reações em condições ideais de consumo do reagente. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Descongele os tubos de positive control de MRSA/SA e de positive control de LGA251/SA para a sessão. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Transfira pelo menos 30 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Elution Tube", fornecido com o ELITE InGenius SP Consumable Set.
4. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
5. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" é de 100 µL.
6. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
7. Para o positive control, selecione MRSA-SA ELITE_PC na coluna "Assay" (Ensaio) e preencha o número do lote e a data de validade do positive control de MRSA/SA.
8. Para o controlo negativo, selecione MRSA-SA ELITE_NC e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
9. Clique em "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue a MRSA/SA Q-PCR Mix no Inventory Block selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue as "PCR Reaction Cassettes", os 2 tubos de positive control (MRSA/SA e LGA251/SA) e o tubo de negative control, seguindo as instruções na GUI. Clique em "Next" para continuar a preparação.
13. Feche a porta do instrumento.
14. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITE InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: Os resultados das execuções de amplificação de Positive Control e Negative Control são usados pelo software do instrumento para preparar os "Gráficos de controlo". São necessários quatro resultados de Positive Control e Negative Control, de quatro execuções diferentes, para preparar o gráfico de controlo. Após isso, os resultados do Positive Control e Negative Control são usados para monitorização dos desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: No final da execução os restantes positive controls podem ser removidos do instrumento, tapados e guardados a -20 °C. O restante negative control deve ser eliminado.

Nota: No final da execução, as Cassetes PCR com os produtos de reação e outros consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem produzirem contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: A PCR Mix pode ser mantida guardada no bloco refrigerado durante um máximo de **15 horas** (5 sessões de trabalho de 3 horas cada).

Revisão e aprovação de resultados

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Results Display". Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios ("Sample Report" ou "Track Report"). Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: o sistema ELITe InGenius pode ser ligado ao "Location Information Server" (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível enviar os resultados da sessão de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

O sistema **ELITe InGenius** gera os resultados utilizando o produto «**MRSA ELITe MGB® Kit**» através do seguinte procedimento:

- A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação,
- B. Validação dos resultados da amostra,
- C. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

A. Validação dos resultados do Controlo Positivo e Controlo Negativo da amplificação

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda específica dos genes mecA e mecC (mecA) e pela sonda específica do gene de SA (SA) na reação de amplificação dos positive controls e negative control são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos protocolos de ensaio "MRSA-SA ELITe_PC" e "MRSA-SA ELITe_NC".

Os resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação, específicos para o lote do reagente de amplificação, são guardados na base de dados (Controlos) após a aprovação pelo "Administrador" ou "Analista" seguindo as instruções na GUI.

Os resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar **após 15 dias**.

Antes de analisar qualquer amostra, é absolutamente obrigatório certificar-se de que o Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação foram executados com o lote do reagente de amplificação a ser usado e que os resultados estão aprovados e válidos. A disponibilidade de resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação "Aprovados" (Estado) é mostrada na janela "Controlos" da GUI. Se os resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação estiverem em falta, crie os mesmos da forma acima descrita.

Nota: Quando os resultados do positive control ou negative control não cumprirem os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "reprovado" no ecrã "Controlos" e não é possível aprovar os mesmos. Neste caso, foi repetida a reação do Positive Control ou Negative Control da amplificação.

Nota: Quando o Positive Control ou Negative Control é executado em conjunto com amostras a serem testadas e o respetivo resultado é inválido, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

B. Validação dos resultados das amostras

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda específica dos genes mecA e mecC (mecA), pela sonda específica do gene SA (SA) e pela sonda de Controlo Interno específica (CI) em cada reação de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos no protocolo de ensaio.

Nota: Antes de analisar qualquer amostra, certifique-se de que os controlos da amplificação foram executados com o lote do reagente de amplificação a ser usado e que os resultados estão aprovados e válidos. A disponibilidade de resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação "Aprovados" (Estado) é mostrada na janela "Controlos" da GUI. Se os resultados do controlo da amplificação estiverem em falta, crie os mesmos da forma acima descrita.

Os resultados são mostrados nos relatórios gerados pelo instrumento ("Exibição dos resultados").

A execução da amostra pode ser aprovada quando forem cumpridas as duas condições reportadas na tabela abaixo.

1) Positive Control	Estado
Positive control de MRSA/SA	APROVADO
Positive control de LGA251/SA	APROVADO
2) Negative Control	Estado
MRSA/SA - Negative Control	APROVADO

Para cada amostra, o resultado do ensaio é automaticamente interpretado pelo sistema como estabelecido pelo algoritmo **ELITe InGenius Software** e os parâmetros do Protocolo do ensaio.

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado de uma Amostra.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
MRSA detetado	Foi detetado ADN de MRSA na amostra.
MRSA/SA não detetado ou inferior ao LdD	Não foi detetado ADN de MRSA/SA na amostra. A amostra é negativa para estes alvos ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
MRSA não detetado ou inferior ao LdD, SA detetado	Não foi detetado ADN de MRSA na amostra. A amostra é negativa para este alvo ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio, foi detetado SA
Inválido - Voltar a testar a amostra	Resultado da amostra não válido devido a falha do Internal Control (Extração incorreta ou transferência do inibidor).

As amostras não adequadas para interpretação dos resultados são reportadas como "Inválido - Voltar a testar a amostra" pelo **ELITe InGenius Software**. Neste caso, o ADN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou inibidor na transferência extraída na eluição), que pode causar resultados incorretos e falsos negativos.

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo "PCR Only". No caso de um segundo resultado inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo "Extract + PCR".

As amostras que são adequadas para análise mas onde não é possível detetar ADN de MRSA/SA são reportadas como: "MRSA/SA: ADN não detetado ou inferior ao LoD". Neste caso não pode excluir-se que o ADN de MRSA/SA esteja presente a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver "desempenho e características").

Nota: Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente.

Os resultados da execução da amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Exibição dos resultados) por pessoal qualificado como "Administrador" ou "Analista", seguindo as instruções na GUI. A partir da janela "Exibição dos resultados" é possível imprimir e guardar os resultados da execução da Amostra como "Sample Report" e "Track Report".

C. Elaboração do relatório do resultado das amostras

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser exportados como "Sample Report" e "Track Report".

O "Sample Report" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho ordenada pela amostra selecionada (SID).

O "Track Report" apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho pelo Rastreo selecionado.

O "Sample Report" e o "Track Report" podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: Limite de detecção

A sensibilidade analítica deste ensaio, como Limite de detecção (LoD) da amplificação de ADN, permite detetar a presença de cerca de 20 cópias em 10 µL de ADN adicionado à reação de amplificação.

O LdD deste ensaio foi testado usando o ADN de plasmídeos que contém os produtos de amplificação cuja concentração inicial foi medida pelo espectrofotómetro. O ADN de plasmídeos foi diluído a um título de 20 cópias/10 µL na presença de 40.000 cópias de internal control (CI) / 10 µL. Estas amostras foram testadas em 18 réplicas a realizarem a amplificação por produtos ELITechGroup S.p.A. em dois instrumentos diferentes.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo	Mec A Ct média	SA Ct média
20 cópias de ADN de MRSA/SA de plasmídeo + 40.000 cópias de CI	18	17	1	35,04	34,43
20 cópias de ADN de LGA251/SA de plasmídeo + 40.000 cópias de CI	18	18	0	34,75	34,12

Sensibilidade analítica: capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi avaliada utilizando como material de referência um painel QCMD 2014 Methicillin Resistant S. aureus EQA Panel (Qnostics Ltd, UK) de diluições de MRSA/SA dentro do limite de concentração. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, utilizando o «ELITe InGenius» e produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITe InGenius»			
Amostra	Conteúdo da amostra	Resultado esperado	Resultado real
MRSADNA14-01	MRSA N315	MRSA detetado	MRSA detetado
MRSADNA14-02	MSSA ATCC 29213	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-03	MSSA 29213 + MRCoNS 634	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-04	E. coli ATCC 35218	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-05	MRSA N315	MRSA frequentemente detetado	MRSA detetado
MRSADNA14-06	Apenas MHB	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-07	MRSA N315	MRSA detetado pouco frequentemente	MRSA detetado
MRSADNA14-08	MRSA mecC	MRSA detetado pouco frequentemente	MRSA detetado
MRSADNA14-09	MRCoNS 634	MRSA Negativo	MRSA Negativo
MRSADNA14-10	MRSA ST398	MRSA detetado	MRSA detetado
MRSADNA14-11	MRSA N315	MRSA frequentemente detetado	MRSA detetado
MRSADNA14-12	MRSA N315	MRSA detetado	MRSA detetado

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

A sensibilidade analítica do ensaio, como a capacidade de reprodução do valor de um material de referência calibrado, foi também avaliada utilizando como material de referência um painel NATrol™ MRSA/SA Panel (Zeptomatrix, US) de S. aureus ou S. epidermidis. Cada amostra do painel foi testada em 2 réplicas realizando todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação do resultado, utilizando o «ELITe InGenius» e produtos ELITechGroup S.p.A..

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com materiais de referência calibrados e o «ELITe InGenius»		
Amostra	Resultado esperado	Resultado real
Estirpe na comunidade de S. aureus_MRSA	Positivo para MRSA	MRSA detetado
Estirpe hospitalar de S. aureus_MRSA	Positivo para MRSA	MRSA detetado
S. aureus_MSSA	Positivo para MSSA	MSSA detetado
S. aureus_MSSA – cassete vazio	Positivo para MSSA	MSSA detetado
S. epidermidis_MSSE HER 1292	Negativo	Negativo

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada pela análise de amostras clínicas de zaragatoa nasal e hemocultura positivas para MRSA e MSSA.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 60 amostras de zaragatoas nasais positivas para MSSA, 21 amostras de zaragatoas nasais positivas para MRSA e 20 zaragatoas nasais que foram reforçadas com ADN de MRSA adicionando MRSA BAA-1556 (ATCC) a um título de 100.000 CFU/mL.

A sensibilidade de diagnóstico foi avaliada utilizando 39 amostras de hemocultura positivas para MSSA, 21 amostras de hemocultura positivas para MRSA e 10 hemoculturas reforçadas com isolados de MRSA, dada a dificuldade em encontrar um número significativo de amostras clínicas positivas para alguns genes alvo de MRSA.

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o «ELITE InGenius» e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Amostras de zaragatoas positivas para ADN de MSSA	60	56	4
Amostras de zaragatoas positivas para ADN de MRSA	41	40	1
Amostras de hemocultura positivas para ADN de MSSA	39	39	0
Amostras de hemocultura positivas para ADN de MRSA	31	31	0

Para as amostras de zaragatoas nasais, 56 em 60 amostras de MSSA foram corretamente detetadas. Quatro (4) amostras apresentaram um resultado negativo. Foram corretamente detetadas 40 de 41 amostras de MRSA. Uma amostra teve um resultado positivo para MSSA.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio em associação com a zaragatoa nasal foi igual a 93% para MSSA e 98% para MRSA.

Para as amostras de hemocultura, todas as amostras foram corretamente detetadas.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio em associação com hemocultura foi igual a 100% para MSSA e 100% para MRSA.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 96% para MSSA e 99% para MRSA.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras negativas, foi avaliada através da análise de 48 amostras clínicas de zaragatoas nasais e 34 amostras clínicas de hemocultura negativas para MRSA/SA.

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, amplificação, detecção e interpretação de resultados com o «ELITE InGenius» e com produtos ELITechGroup S.p.A.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	positivo	negativo
Amostras de zaragatoas nasais negativas para ADN de MRSA/SA	48	0	48
Amostras de hemocultura negativas para ADN de MRSA/SA	34	0	34

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

A especificidade de diagnóstico do ensaio neste teste foi igual a 100%.

OUTROS SISTEMAS

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com o ADN extraído de amostras clínicas de zaragatoas nasais.

As amostras de zaragatoas nasais, destinadas à extração de ADN, devem ser colhidas com gel BBL Culture Swab Plus Amies sem zaragatoas carvão (Becton-Dickinson) e identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais. As amostras de zaragatoas nasais devem ser transportadas e armazenadas a +18 / +25 °C durante até um máximo de um dia; caso contrário, têm de ser armazenadas a +2 / +8 °C durante até sete dias. As amostras de zaragatoas nasais têm de ser imersas em 1 mL de caldo de soja Trypticase (TSB) e submetidas a vórtice durante 10 segundos antes do dar início ao procedimento de extração.

Nota: Quando extrair ADN com o sistema «NucliSENS® easyMAG®», utilize a configuração seguinte.

Defina os parâmetros da extração conforme se segue:

- Matriz = Outro;
- Protocolo = Genérico 2.0.1;
- Volume (mL) = 1,0 mL;
- Eluição (µL) = 50 µL;
- Tipo = Primário.

Transfira **1 mL** de cada amostra para um recipiente de amostras descartável de 8 poços conforme estabelecido na lista de trabalho do instrumento e distribua o tampão de lise. Durante os 10 minutos de incubação, prepare a suspensão de sílica magnética para 8 amostras misturando **550 µL de NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica, 545 µL de água de qualidade para biologia molecular e 5 µL de CPE**. Para cada amostra, use o pipetador BioHit para distribuir 125 µL de suspensão de sílica magnética para a tira NucliSENS easyMAG Strip para pré-mistura. Utilize o pipetador BioHit para transferir 100 µL de suspensão de sílica magnética para cada amostra no recipiente de amostras descartável de 8 poços, misturando bem para cima e para baixo com uma pipeta e, em seguida, dê início ao procedimento de extração.

Substâncias interferentes

Substâncias que podem interferir na detecção de SA e MRSA usando o «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» e gerar resultados potencialmente inválidos incluem o propilenoglicol e quantidades excessivas de secreções nasais/muco.

As substâncias exógenas listadas abaixo, que são componentes de descongestionantes e substâncias usadas no alívio da secura e/ou irritação nasal demonstraram, à exceção do propilenoglicol, não interferir na detecção de MRSA / SA usando o «MRSA/SA ELITE MGB® Kit». Não foi demonstrado que a presença de sangue humano na amostra não interfira na detecção de MRSA / SA usando o «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» em associação com NucliSENS® easyMAG®.

MRSA / SA ELITe MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Substâncias potencialmente interferentes (tipo)	Princípio ativo	Interfere?
Mucina, glândula submaxilar de bovino, tipo I-S	Proteína de mucina purificada	Não
Sangue (humano)	Hemoglobina	Não
Sprays ou gotas nasais	Fenilefrina	Não
	Oximetazolina	Não
	Cloreto de sódio com conservantes	Não
	Cloreto de benzalcônio	Não
	Fosfato de sódio	Não
	Fenilcarbinol	Não
	Propilenoglicol	Sim
	Sorbitol, álcool benzílico	Não
	edetato dissódico, hipromelose	Não
	ácido fosfórico	Não
Corticosteroides nasais	Dexametasona	Não
	Triamcinolona	Não
	Beclometasona	Não
	Flunisolida	Não
	Budesonida	Não
	Mometasona	Não
	Fluticasona	Não
Gel nasal	Luffa operculata, enxofre	Não
Medicamentos homeopáticos para alívio de alergias	Galphimia glauca	Não
	Histaminum hydrochloricum	Não
Vacina	Vacina do vírus vivo contra influenza intranasal	Não
Lozenges garganta, anestésicos e analgésicos orais	Benzocaína, mentol	Não
Medicamentos anti-víricos	Zanamivir, fosfato oseltamivir	Não
Antibiótico, creme nasal	Mupirocina	Não
Antibacteriano, sistêmico	Tobramicina	Não

Foram obtidos dados experimentais de interferências usando a extração NucliSENS® easyMAG® e a plataforma de detecção 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, com uma versão anterior do «**MRSA/SA ELITe MGB® Kit**» do ensaio, que é idêntico ao ensaio atual exceto no facto de os oligonucleótidos específicos de *mecC* estarem ausentes.

Não existem dados disponíveis relativos a uma inibição causada por outros fármacos antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossupressores.

Uma elevada quantidade de ADN genómico humano no ADN extraído da amostra pode inibir a reação de amplificação.

Controlos de amplificação

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com uma reação de controlo negativo e uma reação de controlo positivo.

Para o Negative Control, utilize água de qualidade para biologia molecular (não fornecida).

Para o positive control, utilize duas soluções de produto «**MRSA/SA - ELITe Positive Control**» (não fornecido).

Controlos da qualidade

Recomenda-se a validação de todo o procedimento de análise de cada sessão de extração e amplificação, através do processamento de uma amostra que testou negativo e uma amostra que testou positivo ou um material de referência calibrado.

MRSA / SA ELITe MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

PROCEDIMENTO

Definição da sessão de amplificação em tempo real

(Para realizar na área de amplificação/detecção de produtos de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, siga as recomendações do fabricante fornecidas na documentação do instrumento e:

- ligue o computador, ligue o ciclo térmico em tempo real, execute o software dedicado, abra uma sessão de "quantificação absoluta";
- quando é usado o **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, escolha a definição "Run mode: Rápido 7500";
- create a new "detector" (Modo de execução - criar um novo detetor) no menu Ferramentas, seleccionando o Gestor do Detetor:

- defina o "detetor" para a sonda do gene específico de SA com o "reportador" = "TAMRA" (AP554 é semelhante ao TAMRA) e o "inativador" = "nenhum" (não fluorescente) e dê-lhe o nome "SA";

- defina o "detetor" para as sondas do gene *mecA* e *mecC* com o "reportador" = "FAM", o "inativador" = "nenhum" (não fluorescente) e dê-lhe o nome de "mecA";

- defina o "detetor" para a sonda de controlo interno com o "reportador" = "Cy5" (AP642 é semelhante ao Cy5), o "inativador" = "nenhum" (não fluorescente) e designe-o de "IC";

- vá ao menu Visualizar, selecione o inspetor de poços e, para cada poço em utilização na microplaca, defina (Inspetor de poços) o "detetor" (tipo de fluorescência a ser medida), a "referência passiva" = "ROX" (AP593 é semelhante ao ROX, normalização da fluorescência medida) e o tipo de reação (amostra, negative control da amplificação, positive control da amplificação). Adicione esta informação à **Ficha de trabalho** anexada no final deste manual ou imprima a preparação da microplaca. A **Ficha de trabalho** deve ser atentamente seguida durante a transferência da mistura de reação e das amostras para os furos.

Consulte abaixo um exemplo da forma como a análise qualitativa das 12 amostras pode ser organizada.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	PC1	PC2									

Legenda: S1 - S12: Amostras a serem analisadas; NC: negative control da amplificação;

PC1: positive control de MRSA/SA da amplificação; PC2: Positive control de LGA251/SA da amplificação

Com consulta da documentação do instrumento, definida no software dedicado (Instrumento > Protocolo de ciclo térmico > Perfil térmico) os parâmetros do **ciclo térmico**:

- adicione à etapa de amplificação (Adicionar passo) um **passo de extensão a 72 °C**;

Nota: a aquisição de fluorescência (Instrumento > Protocolo do ciclo térmico > Definições > Recolha de dados) deve ser definida durante o passo de hibridização a 56 °C.

- modifique o tempo como indicado na tabela "**Ciclo térmico**" abaixo;
- defina o número de ciclos para **45**;
- defina o volume de reação para **30 µL**.

MRSA / SA ELITE MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tempo
Descontaminação	50 °C	2 min.
Desnaturação inicial	93 °C	2 min.
Amplificação e deteção (45 ciclos)	93 °C	10 seg.
	56 °C (recolha de dados)	30 seg.
	72 °C	15 seg.

Preparação da amplificação

(A ser realizado na área de extração/preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, é necessário:

- descongelar os tubos que contêm as amostras a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo;
- descongele os tubos da **MRSA/SA PCR Mix** necessários para a sessão, sem esquecer que cada tubo é suficiente para a preparação de **25 reações**. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo durante um máximo de quatro horas;
- pegue e descongele um tubo de **positive control de MRSA/SA** (positive control das reações de amplificação em tempo real para o gene específico de SA e o gene *mecA*). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo durante um máximo de quatro horas;
- pegue e descongele um tubo de **positive control de LGA251/SA** (positive control das reações de amplificação em tempo real para o gene *mecC*). Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo durante um máximo de quatro horas;
- pegue na **microplaca da amplificação** que será usada durante a sessão, tendo cuidado para manusear a mesma com luvas sem pó e para não danificar os furos.

- Distribua exatamente **20 µL** da **MRSA/SA PCR Mix** no fundo dos poços da **microplaca da amplificação**, como previamente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Evite a criação de bolhas.

Nota: Se não usar a totalidade da mistura de reação, guarde o volume restante num local escuro a -20 °C durante um período máximo de um mês. Congele e descongele a mistura de reação um máximo de **5 vezes**.

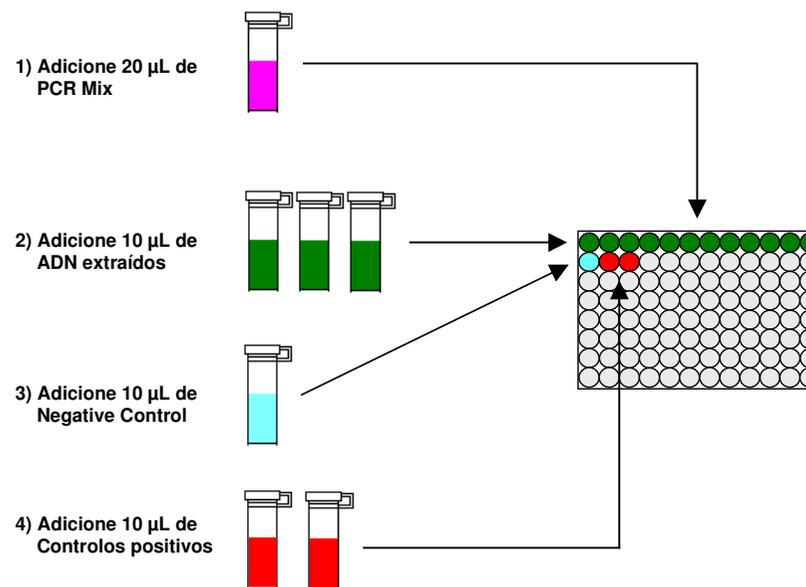
- Adicione à mistura de reação **10 µL** da primeira amostra processada no poço designado, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem a amostra introduzindo com a pipeta o **ADN extraído** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas. Proceda da mesma forma para as outras amostras extraídas.
- Adicione **10 µL** à mistura de reação de **água de qualidade para biologia molecular** (não fornecida) no poço de negative control, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o controlo negativo introduzindo com a pipeta a **água de qualidade para biologia molecular** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
- Adicione à mistura de reação **10 µL** de **MRSA/SA Positive Control** no poço designado, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o standard introduzindo com a pipeta o **MRSA/SA Positive Control** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
- Adicione à mistura de reação **10 µL** de **LGA251/SA Positive Control** no poço designado, conforme anteriormente estabelecido na **Ficha de trabalho**. Misture bem o standard introduzindo com a pipeta o **positive control de LGA251/SA** três vezes na mistura de reação. Evite a criação de bolhas.
- Vede com precisão a **microplaca da amplificação** com recurso à **folha adesiva da amplificação**.
- Transfira a **microplaca de amplificação** para o ciclo térmico em tempo real na área de amplificação/deteção de produtos de amplificação e inicie o ciclo térmico para a amplificação. Guarde a definição da sessão com um nome de ficheiro unívoco e reconhecível (por ex., "ano-mês-dia-MRSA/SA-EGSpA").

Nota: No final do ciclo térmico, a **microplaca da amplificação** com os produtos de reação devem ser removidos do instrumento e descartados sem produzir contaminações ambientais. Para evitar derramar os produtos de reação, a **folha adesiva da amplificação não deve ser removida da microplaca da amplificação**.

MRSA / SA ELITE MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

A figura seguinte ilustra a preparação da reação de amplificação.



Análise qualitativa dos resultados

Os valores registados da fluorescência emitida pela sonda do gene específico de SA (detetor TAMRA "SA"), pelas sondas do gene *mecA* e *mecC* (detetor FAM "mecA") e pela sonda de controlo interno (detetor Cy5 "IC") nas reações de amplificação devem ser analisados pelo software do instrumento.

Antes de iniciar a análise, siga as recomendações do fabricante fornecidas na documentação do instrumento e:

- defina (Resultados > Traçado de amplificação > delta Rn vs. Ciclo) as **Definições da análise** para todos os detetores para **Base de referência automática** e **Ct manual**, com o **Limiar** definido para **0,1**. Prima o botão **Analisar** e **guarde** os resultados.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor do **Limiar** de fluorescência permitem determinar o **Ciclo do limiar (Ct)**, o ciclo em que a fluorescência alcançou o valor do **Limiar**. A Ct é o ciclo quando a fluorescência atinge o valor do **Limiar** e é proporcional à quantidade do alvo inicial.

Nas reações de amplificação de **Positive Control de MRSA/SA** e **Positive Control de LGA251/SA**, os valores da **Ct** dos detetores de SA e *mecA* (Resultados > Relatório) são usados para validar a amplificação e a deteção, conforme descrito na tabela seguinte:

Detetor de reação de controlo positivo TAMRA "SA"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 35	POSITIVO	CORRETO

Detetor de reação de controlo positivo FAM "mecA"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct ≤ 35	POSITIVO	CORRETO

MRSA / SA ELITE MGB® Kit
 Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Se o resultado da reação de amplificação dos **Positive Controls** for **Ct > 35** ou **Ct indeterminada** para os detetores de SA e mecA, o ADN do alvo não foi corretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação ou deteção (distribuição incorreta da mistura de reação ou do positive control, degradação da mistura de reação ou do positive control, definição incorreta da posição do positive control, definição incorreta do ciclo térmico) que podem originar resultados incorretos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Na reação de amplificação de **Negative Control**, os valores de **Ct** de SA, mecA e os detetores IC (Resultados > Relatório) são usados para validar a amplificação e a deteção como descrito na tabela seguinte:

Detetor de reação de negative control TAMRA "SA"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct indeterminada ou Ct > 35	NEGATIVO	CORRETO

Detetor de reação de negative control FAM "mecA"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
Ct indeterminada ou Ct > 35	NEGATIVO	CORRETO

Detetor de reação de Negative Control Cy5 "IC"	Resultado do ensaio	Amplificação/deteção
CT indeterminada ou Ct ≥ 34	NEGATIVO	CORRETO

Se o resultado da amplificação do **Negative Control** for **Ct ≤ 35**, para detetores SA e ou mecA, e **Ct < 34** para o detetor IC, o ADN do alvo foi incorretamente detetado. Isto significa que ocorreram problemas durante o passo de amplificação (contaminação), que podem originar resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e precisa ser repetida a partir do passo de amplificação.

Em cada reação de amplificação da **amostra**, os valores da **Ct** dos detetores de mecA e SA são usados para determinar o ADN do alvo, enquanto o valor de **Ct** do Controlo Interno é usado para validar a extração, amplificação e deteção.

Nota: Verifique com o software do instrumento (Resultados > Lote de amplificação > delta Rn vs Ciclo) que o **Ct** foi determinado por um aumento súbito e regular da fluorescência e não por picos ou um aumento do fundo (fundo irregular ou alto).

Os valores da **Ct** das reações de amplificação de cada **amostra** (Resultados > Relatório) são usados como descrito na tabela seguinte:

Reação da amostra				Resultado do ensaio	
detetor TAMRA "SA" (Ct1)	detetor FAM "mecA" (Ct2)	ΔCt Ct1 - Ct2	detetor Cy5 "IC"	Resultado de SA	Resultado de MRSA
Indeterminado ou Ct > 35	Indeterminado ou Ct > 35	N/A	Ct < 34	Negativo	Negativo
		N/A	Indeterminado ou Ct ≥ 34	Inválido	Inválido
Determinado, Ct ≤ 35	Indeterminado ou Ct > 35	N/A	N/A	Positivo	Negativo
		ΔCt ≥ 2	N/A	Positivo	Negativo
		ΔCt < 2	N/A	Positivo	Positivo
Indeterminado ou Ct > 35	Determinado, Ct ≤ 35	N/A	N/A	Negativo	Negativo

MRSA / SA ELITE MGB® Kit
 Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Resultado do ensaio		Interpretação do resultado
Resultado de SA	Resultado de MRSA	
Negativo	Negativo	Não foi detetado ADN de SA, incluindo MRSA. Presumivelmente negativo para todo o SA, incluindo MRSA, ou o número de organismos pode estar abaixo do limite de deteção.
Inválido	Inválido	Resultado inválido. Repita a execução da extração da amostra ou de uma nova amostra.
Positivo	Negativo	Não foi detetado ADN de MRSA. Presumivelmente negativos para MRSA ou o número de MRSA pode estar abaixo do limite de deteção. ADN de SA detetado. Presumivelmente positivo para SA.
Positivo	Positivo	ADN de MRSA detetado. Presumivelmente positivo para MRSA.

NA = não aplicável

A presença de ambos os marcadores (gene SA e mecA) medidos pelo valor da Ct à mesma quantidade relativa (uma diferença na Ct inferior a 2) é indicativa de MRSA (incluindo uma estirpe de LGA251 recentemente identificada); quantidades relativas diferentes (uma diferença na Ct superior ou igual a 2) ou a presença apenas do marcador do gene específico do *Staphylococcus aureus* é indicativo de SA.

Se o resultado da reação de amplificação da amostra for **Ct indeterminada** ou **Ct > 35** para o detetor SA e mecA e **CT indeterminada** ou **Ct ≥ 34** para o detetor IC, isto significa que foi impossível detetar eficientemente o ADN do controlo interno. Neste caso, ocorreram problemas durante o passo de amplificação (amplificação ineficiente ou inexistente) ou durante o passo de extração (degradação do ADN, perda de ADN durante a extração ou presença de inibidores no ADN extraído) que podem originar resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa de ser repetido, começando pela extração da amostra ou de uma nova amostra do mesmo paciente.

Se o resultado da amplificação da amostra for **Ct indeterminada** ou **Ct > 35** para o detetor SA e **Ct < 34** para o detetor IC, isto significa que o ADN de SA (incluindo MRSA) não foi detetado na amostra processada. A amostra é presumivelmente negativa ou o número de organismos na amostra está abaixo do limite de deteção do produto (consulte Características de desempenho, página 15). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Nota: Quando é detetado ADN de SA ou MRSA numa amostra, o detetor IC pode ser **Ct indeterminada** ou **Ct ≥ 34**. Com efeito, a elevada eficiência da amplificação de SA ou MRSA pode competir com a baixa eficiência da amplificação do controlo interno. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do ensaio é válido.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Desempenho clínico

As características de desempenho do «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» foram determinadas pela comparação do «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» usado em associação com NucliSENS® easyMAG® com MRSA Remel Spectra™ e/ou os testes de aglutinação/suscetibilidade. Foi definida uma amostra positiva para cultura de MRSA verdadeira como uma amostra, em que MRSA foi identificado por qualquer uma das técnicas de cultura utilizadas. Uma amostra positiva para cultura de SA sensível à meticilina verdadeira foi definida como uma amostra negativa para todas as técnicas de cultura usadas, à exceção do teste de aglutinação de látex.

MRSA / SA ELITE MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Foi colhida de cada paciente uma zaragatoa nasal que foi usada para inocular uma placa de ágar de rastreio de MRSA cromogénica seletiva (MRSA Remel Spectra™). Em seguida, a zaragatoa foi inserida num tubo com caldo de soja trypticase e bem misturada, antes de todo o volume da suspensão celular ser processado conforme descrito anteriormente. Cada zaragatoa foi então sujeita a reforço de caldo de soja trypticase com NaCl a 6,5%. As amostras de cultura reforçadas foram inoculadas com placas de ágar de sangue de soja trypticase. Foram usadas colónias de placas de ágar de sangue de soja trypticase para o teste de aglutinação de látex (Remel Staphaurex®). Foram usadas amostras positivas para aglutinação de látex no teste de suscetibilidade da cefoxitina (BD BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Disc Cefoxitin 20), conforme instruído nas respetivas instruções de utilização.

O desempenho do «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» foi calculado face à combinação da cultura cromogénica direta e da cultura do caldo, seguido dos resultados do teste de aglutinação de látex e suscetibilidade à cefoxitina.

As amostras de zaragatoas nasais foram obtidas junto de uma organização de saúde e de doadores saudáveis e foram testadas por uma combinação de métodos de cultura, conforme descrito acima. Foram assim identificadas 20 amostras positivas para cultura da MRSA, 20 positivas para cultura da MSSA e 40 negativas para cultura de SA. Em 40 amostras negativas para cultura de SA, 20 amostras foram reforçadas com a estirpe BAA-2312 de MRSA (contendo o gene *mecC*) próximo do nível do LdD.

Em comparação com o método de referência da cultura, o «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» identificou 100% de amostras positivas para MRSA e *mecC* de MRSA usando o método de referência (sensibilidade de diagnóstico) e 97,5% das amostras negativas (especificidade do diagnóstico). Para as amostras testadas, o valor preditivo positivo de MRSA (PPV) foi de 97,6% e o valor preditivo negativo de MRSA (NPV) foi de 100%.

Resultados de MRSA obtidos com o «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» em comparação com o método de referência.

	Sensibilidade de diagnóstico do <i>mecA</i> de MRSA	Sensibilidade do diagnóstico do <i>mecC</i> de MRSA	Especificidade de diagnóstico de MRSA
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	100%	100%	97,5%
7500 Real Time PCR System	100%	100%	97,5%

Em comparação com o método de referência da cultura, o «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» identificou 95% de amostras positivas (sensibilidade de diagnóstico) para SA usando o método de referência e 100% das amostras negativas (especificidade do diagnóstico). Para as amostras testadas, o valor preditivo positivo de SA (PPV) foi de 100% e o valor preditivo negativo de SA (NPV) foi de 95%.

Resultados de SA obtidos com o «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» em comparação com o método de referência.

	SA Sensibilidade de diagnóstico	SA Especificidade de diagnóstico
7500 Fast dx Real Time PCR Instrument	95%	100%
7500 Real Time PCR System	95%	100%

Limite de deteção

O Limite de Deteção (LdD) do «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» usado em associação com o NucliSENS® easyMAG® foi determinado usando as estirpes mostradas abaixo. As culturas destas estirpes foram quantificadas, diluídas em matrizes nasais simuladas para valores num intervalo de cerca de 5 a 1500 unidades formadoras de colónia (CFU) e absorvidas nas zaragatoas. Todas as diluições foram testadas, e o LdD foi determinado por análise Probit. O LdD para cada estirpe representa o número mais baixo de CFU/zaragatoa ao qual um resultado positivo pode ser obtido com 95% de probabilidade e com pelo menos 95% de confiança. O LdD para cada estirpe foi então verificado testando pelo menos 20 réplicas.

MRSA / SA ELITE MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Lista de estirpes bacterianas para estudos de determinação do LdD

Nº da estirpe	Designação	Descrição	Resistentes aos fármacos
ATCC 29213	Wichita	Estirpe QC	MSSA
ATCC BAA-1556	MRSA252	adquirida em contexto hospitalar, Reino Unido	MRSA
ATCC BAA-2312	M10/0061	LGA251	MRSA

Resultados do limite de deteção (CFU/zaragatoa)

	ATCC 29213	BAA-1556	BAA-2312
ABI 7500 Fast	210	159	237
ABI 7500 Standard	262	141	314

Eficiência de deteção do genótipo (inclusividade)

O desempenho do «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» usado em associação com o NucliSENS® easyMAG® foi testado com o painel de proficiência MRSA/SA QCMD. Todas as estirpes foram corretamente identificadas. Além disso, o ensaio¹ foi testado face a 75 isolados de MRSA e SA sensível à metilina bem caracterizados, representativos da diversidade genética global, incluindo complexos clonais e tipos de sequências, bem como vários tipos de eletroforese de gel de campo pulsado (PFGE) e valores MIC (concentração inibitória mínima). As amostras foram obtidas junto do Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) Program e da American Tissue Culture Collection (ATCC) ou foram cedidas pelo Medical College of Wisconsin². Todas as estirpes foram absorvidas nas zaragatoas próximas do limite de deteção e testadas. Além disso, todas as estirpes de SA sensíveis à metilina foram testadas a 1x10⁶ CFU/zaragatoa. Todas as estirpes de SA sensíveis à metilina testaram positivo para SA e negativo para MRSA. Todas as estirpes de MRSA testaram positivo para MRSA. Dois isolados BORSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina limitrofes) sem o gene *mecA* testaram positivo para SA e negativo para MRSA, o que perfaz uma eficácia global da deteção do genótipo (inclusividade) de 97,3%.

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primers e das sondas fluorescentes no alinhamento das sequências disponíveis na base de dados para os elementos *mecA* de SSC incluindo *mecC* revelou a respetiva conservação e ausência de mutações significativas.

Especificidade analítica (Reatividade cruzada)

A análise do alinhamento das sequências dos primers de SA e da sonda fluorescente com as sequências de espécies filogeneticamente relacionadas com o *Staphylococcus aureus*, microrganismos patogénicos e microrganismos comumente presentes na microflora nasal normal disponíveis em bases de dados para organismos que não o SA, demonstrou a sua especificidade e a ausência de homologia significativa para o «MRSA/SA ELITE MGB® Kit».

¹ Foram obtidos dados experimentais de interferências usando o sistema de extração NucliSENS® easyMAG® e o instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR com uma versão anterior do ensaio, que é idêntico ao ensaio atual exceto no facto de os oligonucleótidos específicos de *mecA*_{LGA251} estarem ausentes.

² Cedido pelo Dr. Nathan A. Ledebouer, Medical College of Wisconsin, WI; as estirpes encontram-se descritas em: Buchan, B.W, Ledebouer, N.A. Identificação de duas estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina limitrofes provenientes de amostras de zaragatoas nas narinas de rotina por um de três ágar cromogénicos avaliados para a deteção de MRSA, microbiologia e doenças infecciosas.2010;134:921-927

Espécies testadas quanto a reatividade cruzada pela análise da base de dados de sequência

Espécies de <i>Staphylococci</i>		Outros organismos	Vírus
<i>Staphylococcus arlettae</i>	CoNS	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Adenovírus tipo 1, 7
<i>Staphylococcus capitis</i>	CoNS	<i>Bacillus cereus</i>	Coronavírus humano 229E, OC 43
<i>Staphylococcus carnosus</i>	CoNS	<i>Bordetella pertussis</i>	Citomegalovírus
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	CoNS	<i>Citrobacter freundii</i>	Coxsackievírus A21
<i>Staphylococcus delphini</i>	MSCoPS	<i>Citrobacter koseri</i>	Vírus Epstein-Barr
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MSCoNS	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	Vírus influenza humano A, B
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MRCoNS	<i>Corynebacterium bovis</i>	Vírus parainfluenza humano 1,2 (taxid:3,4)
<i>Staphylococcus equorum</i>	CoNS	<i>Corynebacterium flavesces</i>	Metapneumovírus humano
<i>Staphylococcus felis</i>	CoNS	<i>Corynebacterium genitalium</i>	Vírus do sarampo
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	CoNS	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Vírus da papeira
<i>Staphylococcus hyicus</i>	CoPS	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vírus sincicial respiratório
<i>Staphylococcus intermedius</i>	CoPS	<i>Enterococcus flavesces</i>	Rinovírus
<i>Staphylococcus kloosii</i>	CoNS	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
<i>Staphylococcus lentus</i>	CoNS	<i>Enterococcus hirae</i>	
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	CoNS	<i>Escherichia coli</i>	
<i>Staphylococcus simulans</i>	CoNS	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Staphylococcus warneri</i>	CoNS	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ,	
<i>Staphylococcus xylosus</i>	MSCoNS	<i>Listeria monocytogenes</i>	
		<i>Micrococcus luteus</i>	
		<i>Moraxella catarrhalis</i>	
		<i>Pasteurella aerogenes</i>	
		<i>Proteus mirabilis</i>	
		<i>Proteus vulgaris</i>	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		<i>Salmonella typhimurium</i>	
		<i>Serratia marcescens</i>	
		<i>Shigella sonnei</i>	
		<i>Streptococcus mitis</i>	
		<i>Streptococcus salivarius</i>	
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	
		<i>Candida albicans</i>	
		<i>Candida glabrata</i>	
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
		<i>Legionella pneumophila</i>	
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
		<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
		<i>Neisseria meningitidis</i>	
		<i>Streptococcus mutans</i>	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
		<i>Homo sapiens</i>	

CoNS = *Staphylococcus coagulase negativo*.
MSCoNS= *Staphylococcus coagulase sensível à metilina*.
MSCoNS= *Staphylococcus coagulase resistente à metilina*.
CoPS= *Staphylococcus coagulase positivo*.

Capacidade de reprodução com material de referência certificado

A sensibilidade analítica do ensaio, como capacidade de reprodução dos resultados comparada com os resultados obtidos com recurso a outros ensaios em diferentes laboratórios, foi verificada através de testes a um painel de material de referência certificado.

Foram realizados testes utilizando como material de referência calibrado e certificado um painel de diluições de MRSA (QCMD 2010 Methicillin Resistant *S. aureus* EQA Panel). O painel é composto por seis amostras contendo concentrações variáveis de MRSA, três amostras contendo *Staphylococcus aureus* (MSSA) sensíveis à metilina, uma amostra contendo *Staphylococci* (MRCoNS) coagulase negativos resistentes à metilina, uma amostra contendo *Escherichia coli* (*E. coli*) e uma amostra negativa verdadeira. Cada ponto do painel foi testado em 2 réplicas através da realização do procedimento de toda a análise: extração com o NucliSENS® easyMAG® e amplificação com produtos ELITEchGroup S.p.A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Testes com material de referência certificado				
ID da amostra	Conteúdo	Conc. da amostra CFU/mL	Resultado esperado	Resultado real
MRSADNA10-04	MRSA	1 x 10 ⁸	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-03	MRSA	5 x 10 ⁷	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-01	MRSA	5 x 10 ⁶	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-09	MRSA	5 x 10 ⁵	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-08	MRSA	5 x 10 ⁵	Frequentemente detetado	Detetado
MRSADNA10-02	MRSA	5 x 10 ⁵	Detetado	Detetado
MRSADNA10-05	MSSA	5 x 10 ⁶	MRSA Negativo	Negativo para MRSA Positivo para SA
MRSADNA10-06	MSSA	1 x 10 ⁷	MRSA Negativo	Negativo para MRSA Positivo para SA
MRSADNA10-07	MSSA	5 x 10 ⁶	MRSA Negativo	Negativo para MRSA Positivo para SA
MRSADNA10-12	MRCoNS	1 x 10 ⁷	Negativo	Negativo
MRSADNA10-10	<i>E. coli</i>	5 x 10 ⁶	Negativo	Negativo
MRSADNA10-11	Apenas MHB	-	Negativo	Negativo

Todas as amostras foram detetadas corretamente.

Transferência / contaminação cruzada

Foi realizado um estudo analítico para avaliar o potencial de contaminação cruzada entre amostras de MRSA elevado (1x10⁷ CFU/mL) e amostras negativas, através do fluxo de trabalho do «MRSA/SA ELITE MGB® Kit». Dois operadores realizaram cinco execuções de extração de 24 amostras (11 amostras de MRSA elevado, 11 amostras negativas, 1 amostra de positivo control e 1 amostra de negative control por execução) numa padrão quadrado (amostras de MRSA elevado interrompidas por amostras completamente negativas). As amostras processadas foram então amplificadas em cinco execuções separadas usando dois padrões quadrados diferentes. O teste da contaminação cruzada deu origem a zero falsos negativos de cinquenta, cinco amostras positivas para MRSA alto e uma amostra falsa positiva em cinquenta e cinco amostras negativas.

Foram obtidos dados de transferência/contaminação cruzada usando a extração NucliSENS® easyMAG® e o instrumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR, com uma versão anterior do «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» do ensaio, que é idêntico ao atual exceto no facto de os oligonucleótidos específicos de *mecC* estarem ausentes.

MRSA / SA ELITe MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com os instrumentos estão registados na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "MRSA ELITe MGB® Kit", FTP M800351.

REFERÊNCIAS

Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004. Am J Infect Control 2004; 32:470-485.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Principles, Practices, and Challenges; A Report. CLSI Document X07-R (ISBN 1-56238-719-7) Wayne, PA:CLSI, 2010.

Jernigan, J.A. et al. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24:409-414.

Garcia-Alvarez, L. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011; 11:595-603.

Stegger, M. et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA_{LG4251}*. Clin Microbiol Infect 2012; 18:395-400.

Ito T. et al. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. Antimicrob Agents Chemother. 2012 October; 56(10): 4997-4999.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto exclusivamente em associação com o sistema de extração de ácidos nucleicos e os instrumentos de PCR em tempo real recomendados.

Utilize este produto apenas com ADN extraído de zaragatoas nasais humanas.

Não utilize com este produto ADN extraído contaminado com mucoproteínas, propilenoglicol, etanol ou 2-propanol. Estas substâncias inibem a amplificação dos ácidos nucleicos e podem dar origem a resultados inválidos.

Não use com este produto ADN extraído contendo uma elevada quantidade de ADN genómico humano que possa inibir a reação de amplificação de ácidos nucleicos.

Os resultados fiáveis dependem de uma identificação, colheita, transporte, armazenamento e processamento adequados das amostras. Para evitar resultados incorretos, é necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com os produtos.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas de amostras clínicas positivas do MRSA, dos positive controls e dos produtos da mesma amplificação. A contaminação cruzada causa resultados falsos positivos. O formato do produto é capaz de limitar contaminações cruzadas. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do estrito cumprimento destas instruções de utilização.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário e áreas de trabalho que sejam adequadas para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação em técnicas de biologia molecular, como extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos, para evitar resultados incorretos.

É necessário ter áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para evitar falsos resultados positivos.

MRSA / SA ELITe MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real do ADN

REF M800351

Este produto requer o uso de vestuário e instrumentos especiais para extração/preparação de reações de amplificação e para amplificação/deteção de produtos de amplificação, para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova tecnologia.

Um resultado obtido com este produto não indica a presença de SA ou MRSA viável, mas é indicativo da presença de SA ou MRSA. Por conseguinte, um resultado positivo não indica necessariamente a falha da erradicação da intervenção, uma vez que pode persistir ADN inviável.

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ADN de SA ou MRSA não foi detetado no ADN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ADN de SA ou MRSA ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver Características de desempenho, página 15). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Um resultado negativo no seguimento de um resultado positivo pode ou não indicar o sucesso da erradicação.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser "Inválidos" devido a uma falha do controlo interno e exigir um novo teste; o que pode causar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Embora raros, polimorfismos na região do ADN bacteriano abrangidos pelos primers e sondas do produto podem prejudicar a deteção.

A deteção de MRSA na presença de quantidade excessivas de transportadores de *mecA* coagulase negativos ou SA sensíveis à meticilina pode ser comprometida.

Staphylococcus aureus resistente à oxacilina limitrofe (BORSA) que não transporta o gene *mecA* não são detetados pelo produto.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com outros dados laboratoriais e clínicos à disposição do médico, e devem ser usados como um complemento nas medidas de controlo das infeções nosocomiais para identificar pacientes que necessitam de precauções aumentadas.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

ADN do alvo não detetado nas reações de positive control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta nos poços da microplaca.	Tenha cuidado quando distribuir reagentes nos poços da microplaca e cumpra a ficha de trabalho. Verifique os volumes da mistura de reação distribuída. Verifique os volumes do positive control dispensados.
Degradação da sonda.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Degradação do standard.	Utilize uma nova alíquota de Positive Control.
Erro na configuração do instrumento.	Verifique as definições do instrumento para as reações de positive control. Verifique as definições do instrumento para o ciclo térmico.

ADN alvo detetado na reação de negative control	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta nos poços da microplaca.	Evite derramar o conteúdo do tubo de teste da amostra. Substitua sempre as pontas entre amostras. Tenha cuidado quando distribuir amostras, negative control e positive control para os poços da microplaca e cumpra a ficha de trabalho.
Erro durante a definição do instrumento.	Verifique as definições de posição das amostras, do negative control e positive control no instrumento.
Microplaca mal vedada.	Tenha cuidado quando vedar a microplaca.
Contaminação da água de qualidade para biologia molecular.	Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da mistura de reação.	Use uma nova alíquota da mistura de reação.
Contaminação da área de extração/preparação para reações de amplificação.	Limpe as superfícies e instrumentos com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.

Fluorescência de fundo irregular ou elevada nas reações	
Causas possíveis	Soluções
Distribuição incorreta ou mistura inadequada da amostra.	Pipete cuidadosamente três vezes, quando misturar amostras, negative controls e positive controls ou standards na mistura de reação. Evite a criação de bolhas durante o passo de distribuição da amostra.

Elevada taxa anômala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação amostra-para-amostra durante as etapas pré-analíticas	Evitar qualquer contacto entre a micropipeta e a parede do tubo. Limpar a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% nova ou ADN/ARN mais limpo após usar a pipeta em cada amostra. Não usar pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. Introduzir as amostras nas últimas posições dos instrumentos, tal como indicado nas GUI do ELITE InGenius. Siga a sequência de carregamento indicada pelo software
Contaminação pelo ambiente laboratorial	Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% nova ou ADN/ARN mais limpo. Realize um ciclo de descontaminação U.V. Utilize um novo tubo da PCR Mix e/ou CPE.

SÍMBOLOS

-  Número do catálogo.
-  Limite máximo da temperatura.
-  Código do lote.
-  Usar até (último dia do mês).
-  Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.
-  Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*.
-  Contém suficiente para "N" testes.
-  Atenção, consulte as instruções de utilização.
-  Conteúdo.
-  Fabricante.

MRSA / SA ELITe MGB® Kit
Reagente para amplificação em tempo real
do ADN

REF M800351

**NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA
LIMITADA**

Este produto contém reagentes produzidos pela Life Technologies Corporation e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Life Technologies Corporation. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

Os reagentes de deteção ELITe® MGB são abrangidos por um ou mais números de patente dos EUA 6.127.121, 6.485.906, 6.660.845, 6.699.975, 6.727.356, 6.790.945, 6.949.367, 6.972.328, 7.045.610, 7.319.022, 7.368.549, 7.381.818, 7.662.942, 7.671.218, 7.715.989, 7.723.038, 7.759.126, 7.767.834, 7.897.736, 8.008.522, 8.067.177, 8.163.910, 8.389.745, 8.969.003, 8.980.855, 9.056.887, 9.085.800, 9.169.256 e números de patente EP 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 bem como os pedidos que estejam atualmente pendentes.

Esta licença limitada permite à pessoa, ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, apenas para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

"ELITe MGB" e o logótipo "ELITe MGB" são marcas comerciais registadas na União Europeia.

ELITe InGenius® é uma marca comercial registada do ELITechGroup.

NucliSENS® easyMAG® são marcas comerciais registadas da bioMérieux SA.

eNAT™ é uma marca comercial da COPAN Italia S.p.A.